



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

1316

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 2月 2日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-026316

[ST.10/C]:

[JP 2001-026316]

出 願 人

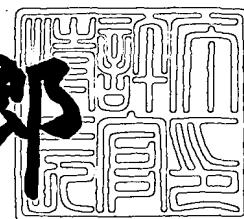
Applicant(s):

三菱化学株式会社
日産化学工業株式会社

2003年 7月 4日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3053492

【書類名】 特許願

【整理番号】 J06459

【提出日】 平成13年 2月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 7/18

【発明の名称】 3 R, 5 S - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 -
(4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3
, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類の製
造方法

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 原 磨理

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000003986

【氏名又は名称】 日産化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100103997

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 暁司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035035

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1
【ブルーフの要否】 要

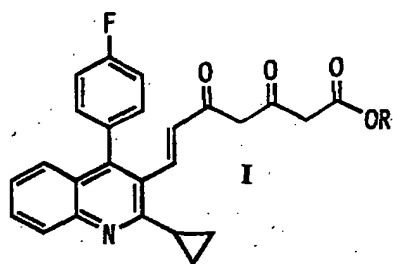
【書類名】 明細書

【発明の名称】 3R, 5S-(E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプト-6-エン酸エステル類の製造方法

【特許請求の範囲】

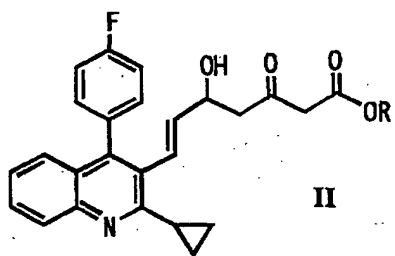
【請求項1】 下記式(I)

【化1】



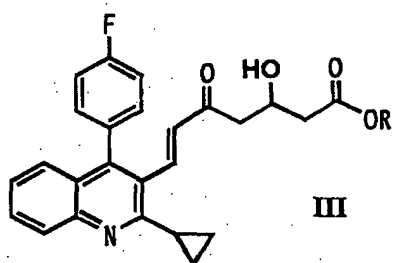
(式中、Rは水素原子、アルキル基またはアリール基を示す) で表される化合物、下記式(II)

【化2】



(式中、Rは前記と同義である) で表される化合物、及び、下記式(III)

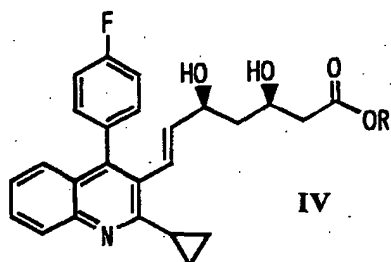
【化3】



(式中、Rは前記と同義である) で表される化合物からなる群より選ばれる化合物を、該化合物の有するケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物の

菌体及び／または該菌体処理物を作用させて、還元することを特徴とする下記式 (IV)

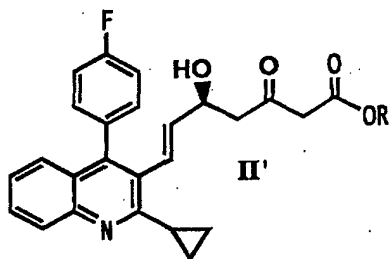
【化 4】



(式中、Rは前記と同義である) で表される化合物の製造方法。

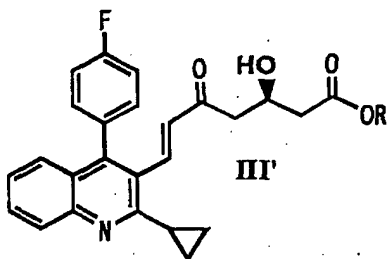
【請求項 2】 式 (II) 及び式 (III) で表される化合物が、それぞれ下記式 (II')

【化 5】



(式中、Rは前記と同義である) 及び下記式 (III')

【化 6】



(式中、Rは前記と同義である) で表される光学活性体であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。

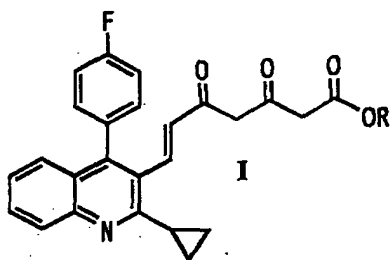
【請求項 3】 式 (II') 及び式 (III') で表される化合物が、それぞれ式 (I

）で表される化合物から得られたものであることを特徴とする請求項2に記載の製造方法。

【請求項4】 微生物が、メシニコウシア (Metschnikowia) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属、オガタエア (Ogataea) 属、シテロマイセス (Citeromyces) 属、ヤロウシア (Yarrowia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、オウレオバシディウム (Aureobasidium) 属、トリゴノプシス (Trigonopsis) 属、シザロサッカロマイセス (Shizosaccharomyces) 属、ウィケルハミエラ (Wickerhamiella) 属、エンドマイコプセラ (Endomycopsella) 属、ピキア (Pichia) 属、サッカロマイコプシス (Saccharomycopsis) 属、サイトエラ (Saitoella) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、ロドスポリジウム (Rhodosporidium) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、アルスロバクター属 (Arthrobacter)、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属及びクルトバクテリウム (Curtobacterium) 属からなる群より選ばれることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の製造方法。

【請求項5】 下記式(I)

【化7】

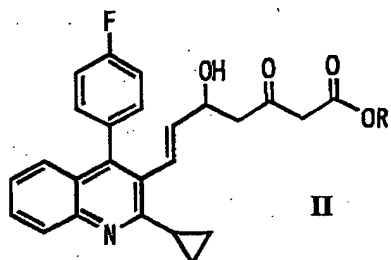


(式中、Rは前記と同義である) で表される化合物にクリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ヤロウシア (Yarrowia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、オウレオバシディウム (Aureobasidium) 属及びトリゴノプシス (Trigonopsis) 属からなる群より選ばれる微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用

させることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項6】 下記式(II)

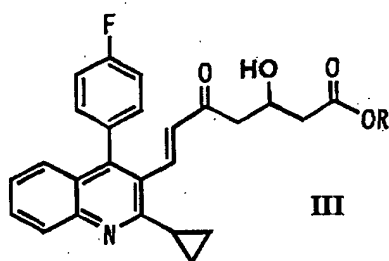
【化8】



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物にメシニコウイア (Metschnikowia) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属、オガタエア (Ogataea) 属、シテロマイセス (Citeromyces) 属、ヤロウイア (Yarrowia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、オウレオバシディウム (Aureobasidium) 属、トリゴノプシス (Trigonopsis) 属、シザロサッカロマイセス (Shizosaccharomyces) 属、ウィケルハミエラ (Wickerhamiella) 属、エンドマイコプセラ (Endomycopsella) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、ロドスポリジウム (Rhodosporidium) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、アルスロバクター属 (Arthrobacter) 及びアルカリゲネス (Alcaligenes) 属からなる群より選ばれる微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させることを特徴とする請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項7】 下記式(III)

【化9】



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物にクリプトコッカス (Crypto

coccus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属及びオガタエア (Ogataea) 属からなる群より選ばれる微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、3 R, 5 S - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類の新規な製造方法に関する。該化合物は、血中コレステロール低下剤として有用であるとして、特開平 1 - 2 7 9 8 6 6 号公報に記載された、「3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル CoA 還元酵素阻害剤」の合成中間体として有用である。

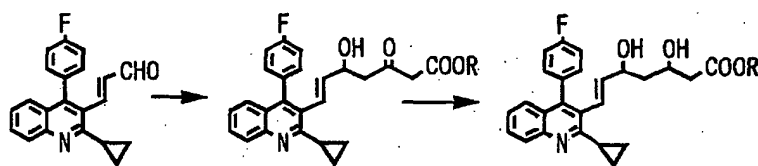
【0002】

【従来の技術】

(E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプト - 6 - エン酸エステル類を化学的に製造する方法としては、例えば、特開平 1 - 2 7 9 8 6 6 号公報に以下に示す製造ルートが知られている。

【0003】

【化 1 0】



【0004】

また、特開平 8 - 9 2 2 1 7 号公報には、光学活性なシッフ塩基を用いて製造する方法も報告されている。

またさらに、特開平 8 - 1 2 7 5 8 5 号公報には、(R) - 3 - tert - ブチルジメチ

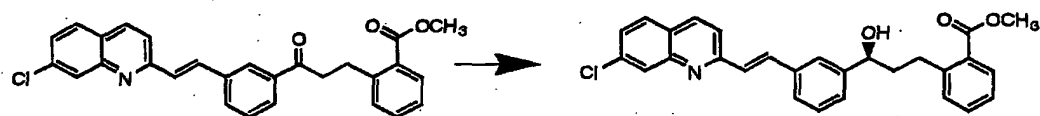
ルシリルオキシ-6-ジメトキシホスフィニル-5-オキソヘキサン酸メチルエステルを用いて極低温にて製造する方法も報告されている。

【0005】

一方、微生物の菌体及び／または該菌体処理物を用いてケト基を有する化合物を立体選択的に還元し、光学活性なアルコール体を生成する方法も提案されている。例えば、ケト基の側鎖にキノリン骨格を有する化合物を用いるものとして、Appl microbiol Biotechnol(1998)49: p. 709-717には、以下に示す反応をミクロバクテリウム キャンボクエマドエンシス (*Microbacterium campoquemadoensis*) MB5614株を用いて行えることが記載されている。

【0006】

【化11】

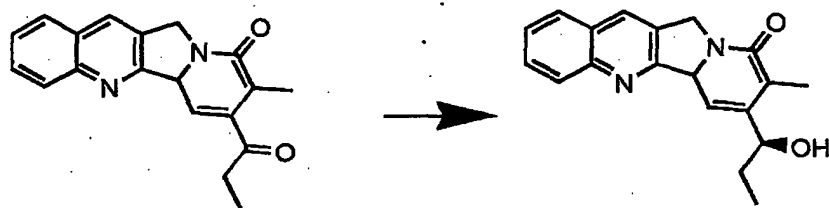


【0007】

また、Bioorg Med Chem Lett, vol8, p1403-(1998)には、以下に示す反応をパン酵母を用いて行えることが記載されている。

【0008】

【化12】



【0009】

しかしながら、(E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-3,5-ジオキソヘプト-6-エン酸エステル類のように、カルボニル基の α 位にオレフィンが存在する上に、カルボニル基が

連続して存在する化合物については、微生物を用いて立体選択的に還元できるという例は知られていなかった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

従って、3R, 5S-(E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプト-6-エン酸エステル類を工業的に安価に製造できる新規な製造方法を新たに開発することが望まれていた。

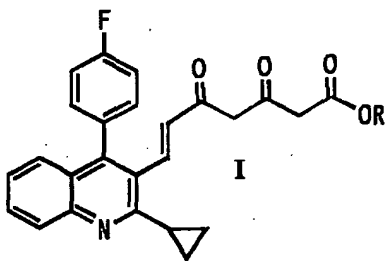
【0011】

【課題を解決する手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、微生物反応を利用したケト基の立体選択的還元反応による、3R, 5S-(E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプト-6-エン酸エステル類の製造方法について、鋭意、検討した結果、下記化合物(I)～(III)および(II')～(III')で示される化合物を原料として用いた場合に、高い光学純度で目的物が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の要旨は、下記式(I)

【0012】

【化13】

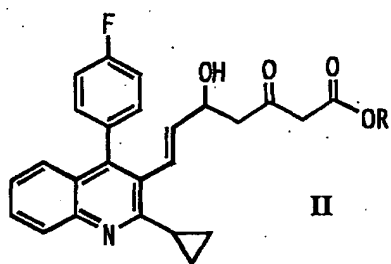


【0013】

(式中、Rは水素原子、アルキル基またはアリール基を示す)で表される化合物、下記式(II)

【0014】

【化 1 4】

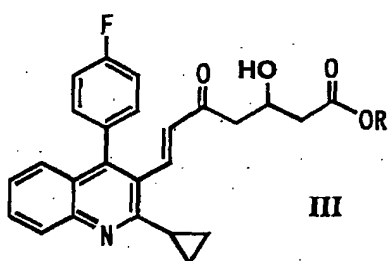


【0 0 1 5】

(式中、Rは前記と同義である) で表される化合物、及び、下記式 (III)

【0 0 1 6】

【化 1 5】

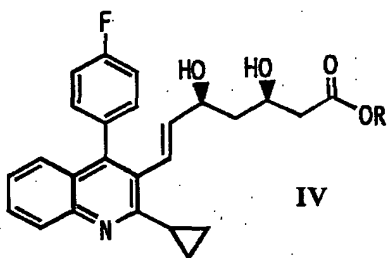


【0 0 1 7】

(式中、Rは前記と同義である) で表される化合物からなる群より選ばれる化合物を微生物の菌体及び／または該菌体処理物を用いて立体選択的に還元すること
を特徴とする下記式 (IV)

【0 0 1 8】

【化 1 6】

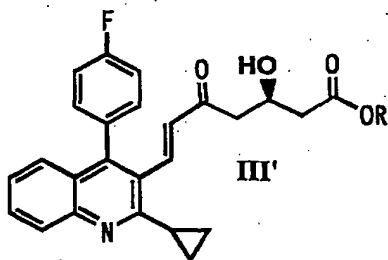


【0019】

(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物の製造方法、及び、新規製造中間体である、下記式(III')

【0020】

【化17】



【0021】

(式中、Rは水素原子、アルキル基またはアリール基である)で表される化合物に存する。

以下に、本発明を詳細に説明する。

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明の方法に用いられる原料である、式(I)～(III)で表される化合物において、Rは、水素原子、アルキル基またはアリール基を示す。

該アルキル基は、直鎖、分岐若しくは環状のアルキル基であり、アルキル基またはアリール基で置換されていてもよい。

アルキル基であるRとしては、メチル基、エチル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ターシャリーブチル基等のC₁～C₄アルキル基及びベンジル基等のアラルキル基等が挙げられる。

アリール基であるRとしては、フェニル基等が挙げられる。

Rは、好ましくは、C₁～C₄の直鎖のアルキル基である。

【0023】

式(I)～(III)で表される化合物は、特開平1-279866号公報、特開平8-127585号公報、特開平5-178841号公報等に記載された方

法と公知の方法を組み合わせることによって、任意に製造することができる。

本発明では、上記式 (I) ~ (III) で表される化合物を微生物の菌体及び／又は該菌体処理物を用い、ケト基を立体選択的に還元することを特徴とする。

【 0 0 2 4 】

本発明に用いられる微生物としては、ケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物であれば特に限定されない。

具体的にはメシニコウイア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*)、メシニコウイア ビカスピダタ (*Metschnikowia bicuspidata*)、メシニコウイア レウカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*) 及びメシニコウイア インテステイナリス (*Metschnikowia intestinalis*) 等のメシニコウイア (*Metschnikowia*) 属に属する微生物；

クリプトコッカス クルバタス (*Cryptococcus curvatus*)、クリプトコッカス フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) 及びクリプトコッカス ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii*) 等のクリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属に属する微生物；

キャンディダ アルビカンズ (*Candida albicans*)、キャンディダ アジマ (*Candida azyma*)、キャンディダ インターメディア (*Candida intermedia*)、キャンディダ ソラニ (*Candida solani*)、キャンディダ ファマタ (*Candida famata*)、キャンディダ グリエモンディ (*Candida guilliermondii*)、キャンディダ パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ ルゴサ (*Candida rugosa*)、キャンディダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) 及びキャンディダ モリシアナ (*Candida molischiana*)、等のキャンディダ (*Candida*) 属に属する微生物；

フィロバシディウム カプサリゲナム (*Filobasidium capsuligenum*) 等のフィロバシディウム (*Filobasidium*) 属に属する微生物；

オガタエア グリコザイマ (*Ogataea glucozyma*)、及びオガタエア ミヌタ (*Ogataea minuta*) 等のオガタエア (*Ogataea*) 属に属する微生物；

シテロマイセス マトリエンシス (*Citeromyces matritensis*) 等のシテロマイセス (*Citeromyces*) 属に属する微生物；

ヤロウィア リポティカ (*Yarrowia lipolytica*) 等のヤロウィア (*Yarrowia*) 属に属する微生物；

ロドトルラ グルティヌス (*Rhodotorula glutinis*) 等のロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する微生物；

オウレオバシディウム マンソニー (*Aureobasidium mansonii*) 等のオウレオバシディウム (*Aureobasidium*) 属に属する微生物；

トリゴノプシス バリアビリス (*Trigonopsis variabilis*) 等のトリゴノプシス (*Trigonopsis*) 属に属する微生物；

シザロサッカロマイセス ポンベ (*Shizosaccharomyces pombe*) 等のシザロサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属に属する微生物；

ウィケルハミエラ ドメルキー (*Wickerhamiella domercqii*) 等のウィケルハミエラ (*Wickerhamiella*) 属に属する微生物；

エンドマイコプセラ クラタエゲンシス (*Endomycopsella crataegensis*) 等のエンドマイコプセラ (*Endomycopsella*) 属に属する微生物；

ピキア ピタソニー (*Pichia petersonii*) 等のピキア (*Pichia*) 属に属する微生物；

サッカロマイコプシス フィブリゲラ (*Saccharomycopsis fibuligera*) 等のサッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属に属する微生物；

サイトエラ コンプリカタ (*Saitoella complicata*) 等のサイトエラ (*Saitoella*) 属に属する微生物；

サッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属に属する微生物；

ロドスポリジウム トルイデス (*Rhodosporidium toruloides*) 等のロドスポリジウム (*Rhodosporidium*) 属に属する微生物；

アシネトバクター カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 等のアシネトバクター属 (*Acinetobacter*) に属する微生物；

アルスロバクター パラフィネス (*Arthrobacter paraffineus*) 等のアルスロバクター (*Arthrobacter*) 属 に属する微生物；

アルカリゲネス エポキシリティカス (*Alcaligenes epoxylyticus*)、アルカリゲ

ネス マルガリタエ (*Alcaligenes margaritae*) 等のアルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属に属する微生物 ;

ブレビバクテリウム リネンス (*Brevibacterium linens*) 等のブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属に属する微生物 ;

セルロモナス ゲリダ (*Cellulomonas gelida*)、セルロモナス フラビゲナ (*Cellulomonas flavigena*)、セルロモナス ウダ (*Cellulomonas uda*) 等のセルロモナス (*Cellulomonas*) 属に属する微生物 ;

コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 等のコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属に属する微生物 ;

クルトバクテリウム フラカムファシエンス (*Curtobacterium flaccumfaciens*) 等のクルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属に属する上記ケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

また、上記微生物の好ましい具体例としては、

メシニコウイア プルケリマ (*Metschnikowia pulcherrima*) I F O 1 4 0 7 株、メシニコウイア ビクスピダタ (*Metschnikowia bicuspidata*) I F O 1 4 0 8 株、メシニコウイア レウカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*) I F O 1 0 7 9 8 及びメシニコウイア インテステイナリス (*Metschnikowia intestinalis*) I F O 1 6 0 5 株 ;

クリプトコッカス クルバタス (*Cryptococcus curvatus*) I F O 1 1 5 9 株、クリプトコッカス フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) I F O 1 0 2 5 0 株、クリプトコッカス ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii*) I F O 0 6 0 9 株、クリプトコッカス ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii*) I F O 1 3 7 6 株、クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii* var *laurentii*) C B S 2 1 7 4 株、クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii* var *laurentii*) C B S 5 7 4 2 株、クリプトコッカス ロウレンティ変種ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii* var *laurentii*) C B S 7 1 4 0 株及びクリプトコッカス

ロウレンティ変種ロウレンティ (*Cryptococcus laurentii* var *laurentii*) C

BS 7235株；

キャンディダ アルビカンズ (*Candida albicans*) IFO 1594株、キャンディダ アジマ (*Candida azyma*) JCM 1691株、キャンディダ インターメディア (*Candida intermedia*) IFO 761株、キャンディダ ソラニ (*Candida solani*) IFO 762株、キャンディダ ファマタ (*Candida famata*) RIFY 7455株、キャンディダ グリエモンディ (*Candida guilliermondii*) IFO566株、キャンディダ パラプシロシス (*Candida parapsilosis*) CBS604株、キャンディダ ルゴサ (*Candida rugosa*) IFO 0591株、キャンディダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) IFO 0618株、キャンディダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) IFO 1404株、キャンディダ トロピカリス (*Candida tropicalis*) IFO 1647株及びキャンディダ モリシアナ (*Candida molischiana*) IFO 10296株；フィロバシディウム カプサリゲナム (*Filobasidium capsuligenum*) IFO 1119株及びフィロバシディウム カプサリゲナム (*Filobasidium capsuligenum*) IFO 1185株；

オガタエア グリコザイマ (*Ogataea glucozyma*) IFO 1472株及びオガタエア ミヌタ 変種ノンファーメンタス (*Ogataea minuta* var *nonfermentans*) IFO 1473株；

シテロマイセス マトリエンシス (*Citeromyces matritensis*) IFO 0651株及びシテロマイセス マトリエンシス (*Citeromyces matritensis*) IFO 0954株；

ヤロウィア リポティカ (*Yarrowia lipolytica*) IFO 1209株；

ロドトルラ グルティニス (*Rhodotorula glutinis*) IFO 0395株；

オウレオバシディウム マンソニー (*Aureobasidium mansonii*) IFO 3133株及びオウレオバシディウム マンソニー (*Aureobasidium mansonii*) IFO 6421株；

トリゴノプシス バリアビリス (*Trigonopsis variabilis*) CBS 1040株及びトリゴノプシス バリアビリス (*Trigonopsis variabilis*) IFO 0671株；

シザロサッカロマイセス ポンベ (*Shizosaccharomyces pombe*) IFO 034
4株;

ウイケルハミエラ ドメルギー (*Wickerhamiella domercqii*) IFO 1827
株;

エンドマイコプセラ クラタエゲンシス (*Endomycopsella crataegensis*) IF
O 1708株;

ピキア ピタソニー (*Pichia petersonii*) IFO 1372株;

サッカロマイコプシス フィブリゲラ (*Saccharomycopsis fibuligera*) IFO
105株;

サイトエラ コンプリカタ (*Saitoella complicata*) IAM 12963株;

サッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) JCM 1818

株、サッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) IFO 56
5株及びサッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) IFO
305株;

ロドスポリジウム トルイデス (*Rhodosporidium toruloides*) IFO 559株
;

アシネトバクター カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) IFO
12552株;

アルスロバクター パラフィネウス (*Arthrobacter paraffineus*) ATCC 15
990株;

ブレビバクテリウム リネンス (*Brevibacterium linens*) JCM 1328株

セルロモナス ゲリダ (*Cellulomonas gelida*) JCM 1489株、セルロモナ

ス フラビゲナ (*Cellulomonas flavigena*) JCM 1490株及びセルロモナ

ス ウダ (*Cellulomonas uda*) JCM 1492株;

コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 1

4067株、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

ATCC 13826株及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacteri
um glutamicum*) ATCC 12813株;

クルトバクテリウム フラカムファシエンス (*Curtobacterium flaccumfaciens*)

ATCC 15990株が挙げられる。

【0026】

又、原料として、式(I)で表される化合物を用いて、式(IV)で表される化合物を製造する場合には、その製造中間体として、式(II')で表される化合物を経由する場合と、式(III')で表される化合物を経由する場合がある。

ついで、式(I)で表される化合物から、あらかじめ式(II')で表される化合物及び式(III')で表される化合物を製造し、単離してから、さらに式(IV)で表される化合物へ誘導してもよいし、式(II')で表される化合物及び式(III')で表される化合物を単離することなく、そのまま式(IV)で表される化合物を製造してもよい。

【0027】

加えて、原料として、式(I)で表される化合物を用いる場合には、1種の微生物を用いて、式(IV)で表される化合物を製造してもよいし、2種以上の微生物を組み合わせて製造してもよい。

原料として、式(I)で表される化合物を用いる場合に特に好ましい微生物としては、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)属、カンディダ(*Candida*)属、フィロバシディウム(*Filobasidium*)属、オガタエア(*Ogataea*)属、ヤロウエア(*Yarrowia*)属、ロドトルラ(*Rhodotorula*)属、オウレオバシディウム(*Aureobasidium*)属及びトリゴノプシス(*Trigonopsis*)属に属する微生物であり、さらに好ましくはクリプトコッカス(*Cryptococcus*)属、カンディダ(*Candida*)属、フィロバシディウム(*Filobasidium*)属、オガタエア(*Ogataea*)属、ヤロウエア(*Yarrowia*)属、オウレオバシディウム(*Aureobasidium*)属及びトリゴノプシス(*Trigonopsis*)属に属する微生物である。

【0028】

原料として、式(II)で表される化合物を用いる場合に特に好ましい微生物としては、

メシニコウエア(*Metschnikowia*)属、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)属、カンディダ(*Candida*)属、フィロバシディウム(*Filobasidium*)属、オガタ

エア (Ogataea) 属、シテロマイセス (Citeromyces) 属、ヤロウィア (Yarrowia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、オウレオバシディウム (Aureobasidium) 属、トリゴノプシス (Trigonopsis) 属、シザロサッカロマイセス (Shizosaccharomyces) 属、ウィケルハミエラ (Wickerhamiella) 属、エンドマイコプセラ (Endomycopsella) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、ロドスポリジウム (Rhodosporidium) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、アルスロバクター (Arthrobacter) 属及びアルカリゲネス (Alcaligenes) 属に属する微生物であり、さらに好ましくは、メシニコウィア (Metschnikowia) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ヤロウィア (Yarrowia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、オウレオバシディウム (Aureobasidium) 属、トリゴノプシス (Trigonopsis) 属、ウィケルハミエラ (Wickerhamiella) 属、エンドマイコプセラ (Endomycopsella) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属及びロドスポリジウム (Rhodosporidium) 属に属する微生物である。

【0029】

原料として、式(III) で表される化合物を用いる場合に特に好ましい微生物としては、

クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キャンディダ (Candida) 属、フィロバシディウム (Filobasidium) 属及びオガタエア (Ogataea) 属に属する微生物であり、さらに好ましくは、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属及びオガタエア (Ogataea) 属に属する微生物である。

【0030】

尚、上記微生物のうち、IFO番号の付された微生物は(財)発酵研究所 (IFO) 発酵のカタログ、第10版(1996)に記載されており、該 IFO から入手することができる。CBS番号の付された微生物はThe Centraalbureau voor Schimmelfcultures (CBS) のList of Cultures、33rd edition(1994)に記載されており、該CBSから入手することができる。NCIMB番号の付された微生物はThe National collections of industrial and marine Bacteria Ltd. (NCIMB) のカタログ(1994)に記載されており、該NCIMBから入手することができる。ATCC番号の付さ

れた微生物はAmerican Type Culture Collection (ATCC) のList of Cultures、19th edition(1996)に記載されており、該ATCCから入手することができる。IAM番号の付された微生物は、IAM Culture Collection (IAM) のカタログ First edition(1993)に記載されており、該IAMから入手することができる。JCM番号の付された微生物はJapan Collection of Microorganism (JCM) のカタログSeventh edition(1999)に記載されており、該JCMから入手することができる。RIFY番号の付された微生物はResearch Institute of Fermentation, Yamanashi Univ. Kofu Japan (RIFY) のカタログに記載されており、該RIFYから入手することができる。

【0031】

上記微生物は、反応に用いる際にそれらの変異株、あるいは細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。

また、組換え株の発現株としては、もとの菌株の他、大腸菌等のバクテリアや酵母などを用いてもよく、これらの組換え株も上記微生物という概念に含まれる。

【0032】

本発明の製造方法においては、上記微生物の1種あるいは2種以上が、菌体及び／または菌体処理物として反応に供される。

具体的には、上記微生物を培養して得られた菌体をそのまま、あるいは培養して得られた菌体を公知の手法で処理したもの、即ち、アセトン処理したもの、凍結乾燥処理したもの、菌体を物理的または酵素的に破碎したもの等の菌体処理物を用いることができる。また、これらの菌体または菌体処理物から還元能力を有する酵素画分を粗製物あるいは精製物として取り出して用いることも可能である。さらには、このようにして得られた菌体、菌体処理物、酵素画分等を通常の固定化技術を用いて、すなわち、ポリアクリルアミド、カラギーナンゲル等の担体に固定化したもの等を用いることも可能である。そこで本明細書において、「菌体及び／または該菌体処理物」の用語は、上述の菌体、菌体処理物、酵素画分、及びそれらの固定化物全てを含有する概念として用いられる。

【 0 0 3 3 】

次に、本発明の製造方法について具体的に説明する。

本発明の製造方法において微生物は、通常、培養して用いられるが、この培養については定法通り行うことができる。本微生物の培養の為に用いられる培地には本微生物が資化する炭素源、窒素源、及び無機イオン等が含まれる。炭素源としては、グルコース、フルクトース、サッカロース等の炭水化物、グリセロール、マンニトール、キシリトール等のポリアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。窒素源としては、N Z アミン、トリプトース、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、大豆抽出物などの有機窒素源、あるいは硫酸アンモニウム塩、硝酸アンモニウム塩などの無機窒素源、その他などが適宜使用される。無機イオンとしては、リン酸イオン、マグネシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、モリブデンイオンその他が必要に応じ適宜使用される。更に、イノシトール、パントテン酸、ニコチン酸アミドその他のビタミン類を必要に応じ添加することは有効である。培養は、好氣的条件下に、p H 約 3 ～ 1 1、温度約 4 ～ 5 0℃の適当な範囲に制御しつつ、1 ～ 1 0 0 時間行う。

【 0 0 3 4 】

反応方法として、本微生物を培養し、得られた菌体及び／または該菌体処理物を含む水性媒体に式 (I) ～ (III) で表される化合物及び／またはそれらの混合物を添加し、目的とする式 (IV) で表される化合物を得る方法、培地に式 (I) ～ (III) で表される化合物及び／またはそれらの混合物を添加し培養と反応を同時に行う方法、あるいは、培養終了後、そのままの培地に、式 (I) ～ (III) で表される化合物及び／またはそれらの混合物を添加して、更に続けて反応を行う方法等を適宜用いることができる。

【 0 0 3 5 】

上記水性媒体としては、リン酸ナトリウムやリン酸カリウムなどを用いた緩衝液、及び、その緩衝液に有機溶媒や界面活性剤などを適宜加えたものを示す。

有機溶媒としては、ジメチルスルホキシド (DMSO) やテトラヒドロフラン (THF) 等の水溶性溶媒や酢酸ブチルやヘキサン等の非水溶性有機溶媒などが挙げられる。界面活性剤としては Tween 80 やシュガーエステルなどが挙げ

られる。

【0036】

緩衝液の濃度としては1M以下、好ましくは0.2M以下の濃度で用いるのがよい。

反応は温度4～70℃、好ましくは15～50℃の範囲で行い、pHは2～9、好ましくは4～8の範囲で行う。

式(I)～(III)で表される化合物及び／またはそれらの混合物の濃度としては、反応液に対して、0.0001～10wt%、好ましくは0.001～5wt%の範囲が望ましく、必要ならば、式(I)～(III)で表される化合物及び／またはそれらの混合物は、反応の間、追補添加してもよい。

【0037】

また、反応を促進するために補酵素や補酵素の再生システムあるいは炭素源を適宜添加してもよい。

補酵素としては、通常、NADHあるいはNADPHが挙げられる。添加量としては反応基質の100万分の1当量～10当量、好ましくは1万分の1当量～2当量である。

【0038】

補酵素の再生システムとしては、蟻酸脱水素酵素など、 NAD^+ をNADHに還元する酵素と NAD^+ 、あるいはグルコース脱水素酵素等の NADP^+ をNADPHに還元する酵素と NADP^+ の組み合わせ等が挙げられる。補酵素を再生するこれらの酵素は市販のものでもよいし、補酵素の再生能を有する微生物の菌体及び／または該菌体処理物でもかまわない。これらシステムの添加量は反応基質の量にあわせて適宜添加される。

【0039】

炭素源としては、反応に用いる菌体及び／または該菌体処理物が補酵素を再生するために利用しうる炭素源であればいずれでもかまわないが、例えばグルコース、フルクトース、サッカロース等の炭水化物、グリセロール、マンニトール、キシリトール等のポリアルコール類、有機酸その他が適宜使用される。添加量としては0.0001～50wt%好ましくは0.01～10wt%である。

【 0 0 4 0 】

上記の通り、反応は水性媒体を用いて行われるが、式 (I) ~ (III) で表される化合物は、水に対しての溶解度が低いため、有機溶媒や界面活性剤等にあらかじめ溶解あるいは懸濁して添加する事により反応系中に均一に分散させる方が好ましい。

上記製造方法で得られる式 (IV) で表される化合物は、通常、反応液から有機溶媒で抽出した後に、通常の精製方法、すなわちクロマトグラフィーや晶析技術を用いることで不純物を除去し、精製された式 (IV) で表される化合物を得ることができる。あるいは、式 (IV) で表される化合物を有機溶媒などで可溶化した後に微生物などの固形分を遠心分離、フィルタープレス、限外濾過などの通常の分離装置によりを除去することで、式 (IV) で表される化合物を含有する液体を得、その液体を通常の方法で、すなわちクロマトグラフィーや晶析技術を用いることで不純物を除去し、精製された式 (IV) で表される化合物を得ることができる。

【 0 0 4 1 】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、その要旨を越えない限り本発明の技術分野における通常の変更をすることができる。

参考例 (E) - 7 - [2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-3, 5-ジオキソヘプト-6-エン酸エチルエステル (以後、DOXEと略す) の合成

攪拌機、滴下ロートおよび温度計を付けた 500 mL の四つ口フラスコに、(E) - 7 - [2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-5-ヒドロキシ-3-オキソヘプト-6-エン酸エチルエステル (以後、MOLEと略す) 5.02 g (11.22 mmol) およびアセトン 420 mL を加え攪拌する。調製された Jones 酸化剤 (濃硫酸 3 mL と酸化クロム 3.35 g を混合させた後、水で 25 mL まで希釈することにより得られた試剤) 10.5 mL を 0℃ で 20 分を要して滴下し、氷冷下で 2 時間攪拌を行った後、メタノール 10 mL をゆっくり加えて反応を停止した。次に反応混合液を

減圧下、アセトンを留去させた後、酢酸エチル 250 mL を加え、得られた溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 60 mL で 2 回、引き続き飽和食塩水溶液 60 mL で 2 回抽出・分液した後、酢酸エチル溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した後、シリカゲルクロマトグラフィー（溶出溶媒；ヘキサン：酢酸エチル = 2 : 1）で精製して、標記化合物 3.03 g（収率：60.6%）を得た。

【0042】

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.79-7.19(8H, m), 7.71(1H, d), 6.03(1H, d), 5.51(1H, s), 4.21(2H, q), 3.40(2H, s), 2.35-2.40(1H, m), 1.39-1.41 (2H, m), 1.28(3H, t), 1.07-1.09(2H, m).

実施例 1

イーストエキス 5 g/L、ポリペプトン 5 g/L、麦芽エキス 3 g/L、グルコース 20 g/L の組成からなる液体培地 2.5 mL に、表 1 に示した各種の菌株を接種し、30℃で 21 時間好氣的に培養した。得られた培養液を 1 mL づつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体に化合物 (I)（式中、R = エチル基の化合物：DOXE）を含む反応液を 0.25 mL 加え、30℃で 20 時間好氣的に反応させた。

【0043】

尚、上記反応液の組成は、DOXE を 0.3 g/L、グルコース 20 g/L、ジメチルスルホキシド (DMSO) 20 mL/L、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) である。

反応終了後、反応液に酢酸エチルを 0.5 mL 加え激しく混合し、遠心分離にて有機層と水層とに分離した。有機層を別の容器に移し、溶媒を濃縮遠心機で留去し、乾固された生成物を酢酸エチル 0.01 mL で溶解し、薄層クロマトグラフィー (TLC) をおこなった。TLC はシリカゲルプレート (メルク社製 silica gel 60 F₂₅₄) を用い、展開溶媒はヘキサン/酢酸エチル = 1/1 を用いた。展開終了後、UV ランプにて生成物の確認をした。化合物 (I) は $R_f = 0.76 \sim 0.86$ 、化合物 (II) および化合物 (III) は $0.54 \sim 0.61$ 、化合物 (IV)（式中、R = エチル基の化合物：以下、DOLE と略す）は R

$f = 0.33$ である。DOLEのTLC上のスポットを掻き取りイソプロパノール0.25mLで溶出し、遠心分離後上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて光学純度およびTLC掻き取りサンプルの濃度を分析した。

【0044】

HPLCの条件は以下の通りである。

カラム：CHIRALCEL AD（ダイセル化学工業株式会社製）

溶離液：ヘキサン／エタノール＝9／1

流速：0.5ml/min

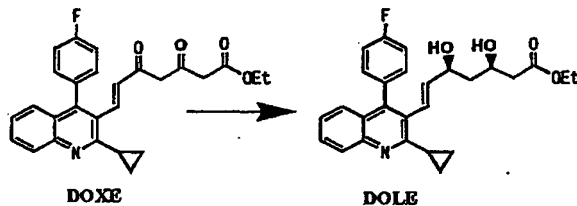
検出：UV 254nm

温度：室温

結果を表1に示す。

【0045】

【表1】



使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (ジアステロマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
キャンディダ ファマタ RIFY 7455	7.1mg/L (97.1%d.e., 100.0%e.e.)
クリプトコッカス ロウレンティ IFO 0809	0.4mg/L (100.0%d.e., 100.0%e.e.)
フィロバシディウム カプサリゲナム IFO 1185	2.7mg/L (100.0%d.e., 100.0%e.e.)
オガタエア ミヌタ変種ノンファーマメンタス IFO1473	7.4mg/L (92.0%d.e., 100.0%e.e.)

【0046】

実施例2

表2に示した各種の菌株を実施例1と同様に培養と反応を行い、化合物（IV）（式中、R＝水素の化合物：以下、DCOOHと略す）のTLC上のスポットを掻き取りイソプロパノール0.25mLで溶出し、遠心分離後、上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分析した。

【0047】

HPLCの条件は以下の通りである。

カラム：CHIRALCEL AD（ダイセル化学工業株式会社製）

溶離液：ヘキサン／エタノール／トリフルオロ酢酸＝900／100／1

流速：1 ml/min

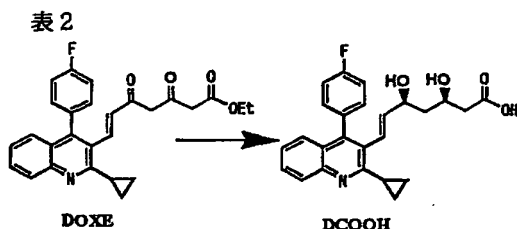
検出：UV 254 nm

温度：室温

結果を表2に示す。

【0048】

【表2】



使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (ジアステロマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
キャンディダ ファマタ RIFY 7455	1.3mg/L(94.0%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ パラプシロシス CBS 604	0.3mg/L(100.0%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ アルビカンス IFO1594	0.7mg/L(81.8%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ トロピカリス IFO0618	1.1 mg/L(89.6%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ トロピカリス IFO1404	0.6mg/L(100.0%d.e., 100.0%e.e.)
フィロバシディウム カプサリゲナム IFO 1185	3.8mg/L(94.7%d.e., 100.0%e.e.)
ヤロウィア リボティカ IFO1209	0.7mg/L(92.5%d.e., 100.0%e.e.)
トリゴノプシス バリアピリス CBS 1040	0.9mg/L(79.2%d.e., 100.0%e.e.)
クリプトコッカス クルバタス IFO1159	14.5mg/L(87.3%d.e., 100.0%e.e.)
クリプトコッカス フミコラス IFO10250	2.1mg/L(100.0%d.e., 100.0%e.e.)

【0049】

実施例3

表3に示した各種の菌株を実施例1と同様に培養を行い、DOXEの代わりにMOLEを用いて同様に反応を行い、化合物(IV)(式中、R=水素の化合物：以下、DCOOHと略す)のTLC上のスポットを掻き取りイソプロパノール0.25mLで溶出し、遠心分離後、上清を上記と同様の条件で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて光学純度を分析した。

【0050】

【表 3】

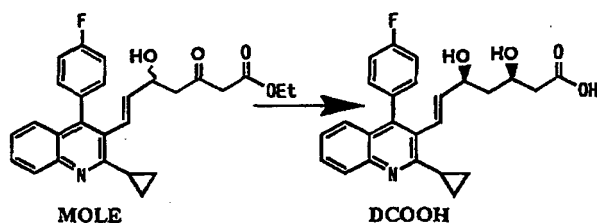


表 3

使用微生物	TLC掻き取りサンプルの濃度 (ジアステレオマー過剰率、エナンチオマー過剰率)
キャンディダ ルゴサ IFO 0591	0.5mg/L (85.6%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ モリシアナ IFO 10296	1.8mg/L (71.9%d.e., 100.0%e.e.)
キャンディダ パラプシロシス CBS 604	2.8mg/L (71.8%d.e., 100.0%e.e.)
クリプトコッカス ロウレンティ IFO 0609	0.1mg/L (100.0%d.e., 100.0%e.e.)
オウレオバシディウム マンソニー IFO 6421	9.9mg/L (71.4%d.e., 100.0%e.e.)
オウレオバシディウム マンソニー IFO 3133	5.2mg/L (73.1%d.e., 100.0%e.e.)
トリゴノプシス バリアピリス IFO 0671	0.5mg/L (89.9%d.e., 100.0%e.e.)

実施例 4

イーストエキス 5 g/L、ポリペプトン 5 g/L、麦芽エキス 3 g/L、グルコース 20 g/Lの組成からなる液体培地 2 Lに、フィロバシディウム カプサリゲナム (*Filobasidium capsuligenum*) IFO 1185株を接種し、30℃で21時間好氣的に培養した。得られた培養液を遠心分離し、菌体を集めた。10% (w/v) の菌体懸濁液を10 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7) を用いて作成し、この懸濁液12 mLを30 φの試験管6本にとりそれぞれに10% (w/v) のDOXE (DMSO溶液) 0.1 mLおよび50% (w/v) のグルコース溶液0.15 mL加え、30℃で20時間好氣的に反応させた。

【0051】

反応終了後、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。抽出物は、実施例1と同条件でTLCを行い、化合物(III)を含む部分を掻き取り、掻き取ったシリカゲルから酢酸エチルにて抽出し、サンプルを¹H-NMRにて分析した。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.02 (dt, J=6.4, 3.2 Hz, 2H)、1.21 (t, J=7.2 Hz, 3H)、1.33 (dt, J=6.4, 3.2 Hz, 2H)、2.26 (m, 1H)、2.43 (d, J=6.4 Hz, 2H)、2.60-2.66 (dd, J=6.4, 6.4 Hz, 2H)、3

・ 3 7 (m, 1 H)、4. 1 1 (q, J = 6. 8 H z, 2 H)、4. 3 4 - 4. 4 1 (m, 1 H)、6. 2 7 (d, J = 1 6. 8 H z, 1 H)、7. 0 6 - 7. 3 6 (m, 6 H)、7. 5 2 - 7. 6 2 (m, 1 H)、7. 6 0 (d, J = 1 6. 8 H z, 1 H)、7. 9 0 (d, J = 8. 4 H z, 1 H)

以下の条件で高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を用いて光学純度を分析したところ、化合物 (III') が光学純度は 8 7. 3 % e e で得られたことがわかった。

カラム : CHIRALCEL AD (ダイセル化学工業株式会社製)

溶離液 : ヘキサン / エタノール / トリフルオロ酢酸 = 9 0 0 / 1 0 0 / 1

流速 : 1 ml/min

検出 : U V 2 5 4 n m

【 0 0 5 2 】

【発明の効果】

本発明によれば、3 R, 5 S - (E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - キノリン - 3 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシーヘプト - 6 - エン酸エステル類を光学純度よく、かつ、効率的に製造することができる。

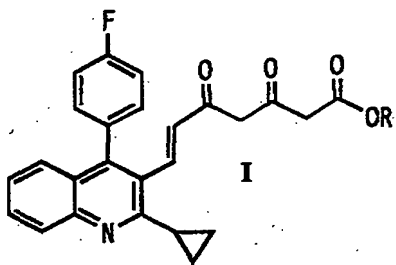
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 3R, 5S-(E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-キノリン-3-イル]-3,5-ジヒドロキシヘプト-6-エン酸エステル類の新規な製造方法を提供する。

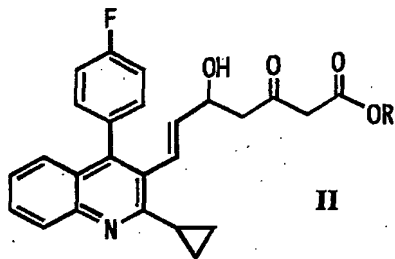
【解決手段】 下記式(I)

【化1】



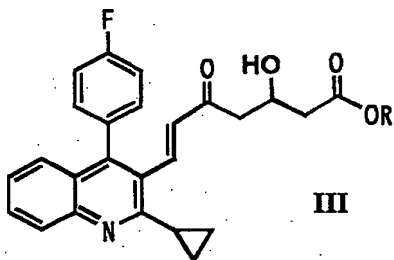
(式中、Rは水素原子、アルキル基またはアリール基を示す)で表される化合物、下記式(II)

【化2】



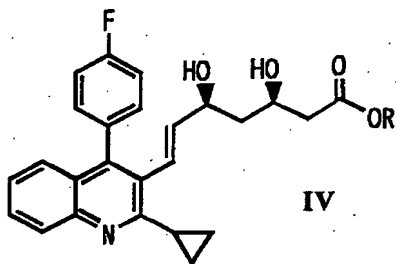
(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物、及び、下記式(III)

【化3】



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物からなる群より選ばれる化合物を、該化合物の有するケト基を立体選択的に還元しうる能力を有する微生物の菌体及び／または該菌体処理物を作用させて、還元することを特徴とする下記式(IV)

【化 4】



(式中、Rは前記と同義である)で表される化合物の製造方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003986]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田錦町3丁目7番地1

氏 名 日産化学工業株式会社